

· 论 著 ·

槲皮素对人肝癌细胞生长、迁移能力的影响及机制研究*

周 进¹, 方 丽^{2△}, 姚文秀¹, 熊竹娟¹, 周 详¹, 周 行¹, 谢 华¹

(1. 四川省肿瘤医院肿瘤内科, 成都 610041; 2. 成都医学院第一附属医院消化内科, 成都 610500)

摘要:目的 探讨槲皮素对人肝癌细胞(HepG2)生长增殖及迁移能力的影响及机制。方法 培养对数生长的 HepG2 细胞, MTT 试验分析槲皮素对 HepG2 生长的影响, 划痕实验观察加入槲皮素前、后 HepG2 迁徙能力的变化。Western blot 检测其中细胞迁移黏附因子(IQGAP1)表达的变化。结果 加入槲皮素后, HepG2 细胞逐渐变圆、脱落, 增殖变慢; MTT 实验显示 HepG2 细胞的生长抑制效应与槲皮素有浓度、时间依存关系; Western blot 显示加入槲皮素后 HepG2 细胞中 IQGAP1 表达明显降低。结论 槲皮素能明显抑制 HepG2 细胞生长增殖, 减弱其迁移能力, 从而达到抑制恶性细胞增殖转移的作用, 这种能力可能是通过抑制 IQGAP1 表达实现的。

关键词: 肝肿瘤, 实验性; 槲皮素; 人肝癌细胞; 细胞运动

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.08.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)08-0845-03

Study on influence of quercetin on proliferation and migration of HepG2 cells and its mechanism*

Zhou Jin¹, Fang Li^{2△}, Yao Wenxiu¹, Xiong Zhujuan¹, Zhou Xiang¹, Zhou Hang¹, Xie Hua¹

(1. Department of Oncology, Sichuan Tumor Hospital, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of quercetin on proliferation and migration of HepG2 cells and its mechanism. **Methods** HepG2 cells in logarithmic growth phase were cultured. The influence of quercetin on the growth of HepG2 cells was analyzed by MTT test. The cell migration change after adding quercetin was observed by the scratch test. Western blot assay was adopted to detect the expression change of Ras GTPase-activating-like protein(IQGAP1) in HepG2 cells after quercetin treatment. **Results** After adding quercetin for 24 h or more time, HepG2 cells turned to circle, fell down from wall, and proliferated slowly. The MTT test showed that quercetin inhibited HepG2 cells proliferation in a time- and dose-dependent manner. Western blot showed that after adding quercetin, the expression of IQGAP1 in HepG2 cells was obviously decreased. **Conclusion** Quercetin can obviously inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells to achieve to inhibit the proliferation and transferring of malignant cells. This ability of quercetin is partly realized through the inhibition of IQGAP1 gene expression.

Key words: liver neoplasms, experimental; quercetin; HepG2 cells; cell movement

恶性肿瘤是目前的医学难点。传统的治疗手段包括手术、放疗、化疗以及最近新兴的生物靶向治疗。然而, 对于化学治疗来说, 尽管药物众多, 但强烈的不良反应限制了许多联合方案的运用, 迫切需要寻找高效低毒的抗肿瘤新型药物。近年来, 天然植物提取物——小分子黄酮类受到研究者的强烈关注。黄酮类主要包括了姜黄素、槲皮素和厚朴等。他们存在广泛, 体外及动物实验研究表明其能抑制子宫内腺癌、前列腺癌、结肠癌、鼻咽癌、肺癌、白血病等多种恶性细胞生长^[1-4]。本课程研究拟通过生长抑制试验及划痕检测, 观察槲皮素对人肝癌细胞(human hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2)生物学行为的影响, 并对其机制进行初步探讨。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂 槲皮素 100 mg(批号: 051K1225)购自 Sigma 公司。使用时经二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解, Dulbecco 最低必需培养基(Eagle's minimum essential medium, DMEM)培养基稀释成所需浓度, 其中 DMSO 终浓度小于 0.1%。胎牛血清、DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶(Tyrisin)购自 Promega 公司, HepG2 细胞由四川大学生物治疗国家重点实验室留存。

1.2 HepG2 细胞生长形态学观察 复苏冻存的 HepG2 细胞, 于 5%CO₂、37%湿度的孵箱中培养。倒置显微镜(Olympus)对槲皮素作用前、后 HepG2 细胞的生长速度、形态、悬浮细胞比例进行比较、评估。

1.3 生存抑制实验[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT] HepG2 细胞生长至对数期, 胰蛋白酶消化, 以 10⁴ 个/每孔的密度接种于 96 孔培养板, 每孔体积约 200 μL。继续培养 24 h, 依次加入浓度为 10、20、50、100 和 200 μmol/L 的槲皮素稀释液, 以含 0.1% DMSO 的 DMEM 培养基为空白对照, 分别培养 24、48 和 72 h。加入 MTT 液(5 mg/mL)20 μL, 孵育 4 h, 加入 100 μL DMSO, 振荡 10 min, 全自动酶标仪(490 nm)测定各孔的光吸收值(A), 按公式: 生存抑制率 = 1 - 药物组 A / 空白对照组 A × 100% 进行计算。

1.4 细胞划痕实验 将细胞培养于 6 孔培养皿, 接种密度为 1 × 10⁵ / 孔。待细胞生长至约 80% 培养皿时, 用 200 μL 移液枪尖在细胞中做一划痕, 宽度约 2 mm。磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗培养皿以移去上层悬浮细胞。加入 50 μM 浓度的槲皮素稀释液, 以正常 DMEM 培养基为空白对

* 基金项目: 四川省卫生厅科学基金资助项目(100572)。作者简介: 周进(1979~), 主治医师, 在读博士研究生, 主要从事恶性肿瘤发病及生物学行为干预研究。△ 通讯作者, Tel: 13348939726; E-mail: zhoutj521@163.com。

照。继续培养,使用数码照相系统(Carl Zeiss, Axiovert200, SIP No. MICO1223, 德国)于实验后 24、48 h 对同一划点照相,重复 3 次,并将图片数据输入 Scion 软件,计算划痕空白剩余面积,进行统计学比较。

1.5 Western blot 检测 槲皮素作用前、后 HepG2 细胞中细胞迁移黏附因子(Ras GTPase-activating-like protein, IQGAP1)的表达差异:细胞裂解液裂解 HepG2 细胞,提取总蛋白,定量。电泳分离、转膜。50 g/L 脱脂奶粉缓冲液 4 ℃ 封闭过夜,加一抗 IQGAP1(1:200)室温振荡孵育 2 h,洗膜 30 min 后加二抗(1:8000)室温振荡孵育 1 h,洗膜,暗盒显影。内参选用 β -actin。

1.6 统计学处理 应用 SPSS11.0 软件进行统计学数据处理,将 MTT 检测数据和划痕修复面积进行统计学处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素处理细胞后形态学变化 正常 HepG2 细胞生长

旺盛,紧贴培养瓶壁生长,轮廓清楚,胞浆饱满,细胞间接触紧密。经槲皮素处理后,细胞变圆,增殖变慢,附壁疏松,脱壁,周围碎片增多。随着槲皮素作用时间和浓度的增加,上述变化愈加明显。

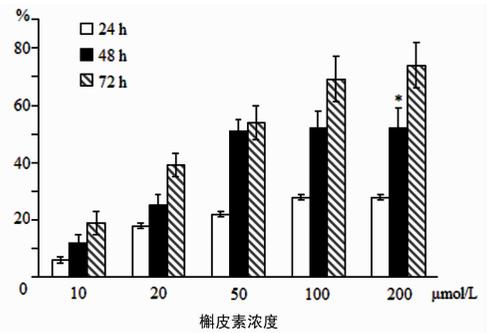
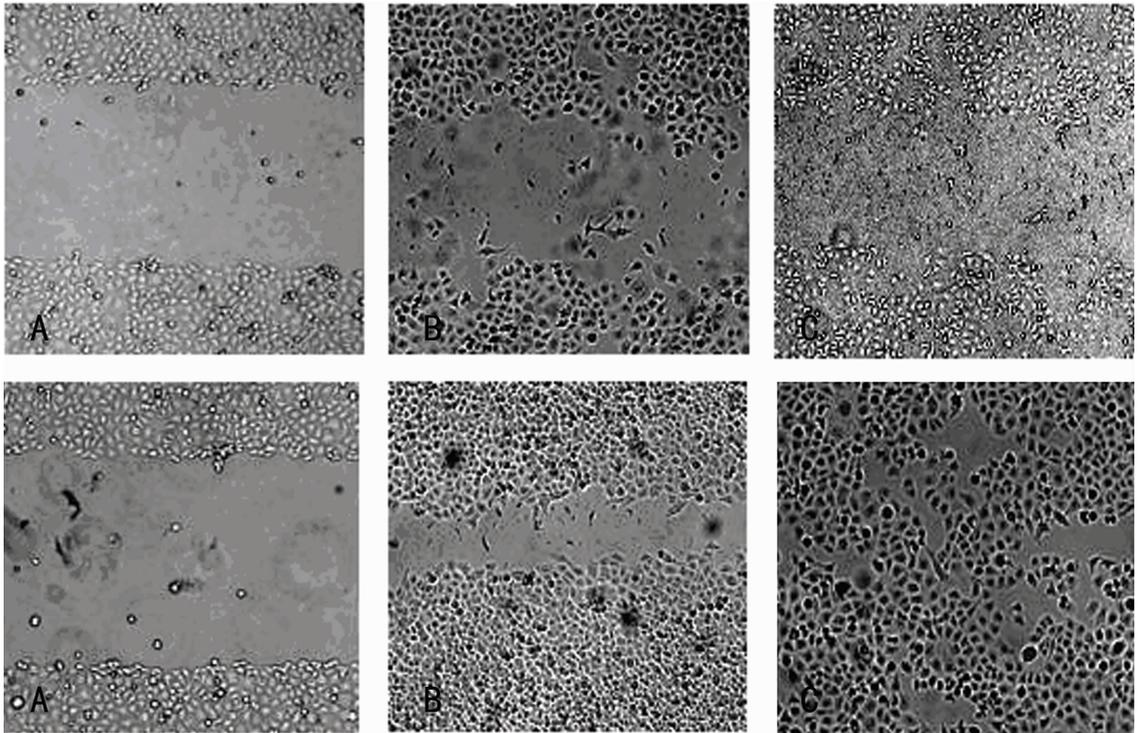
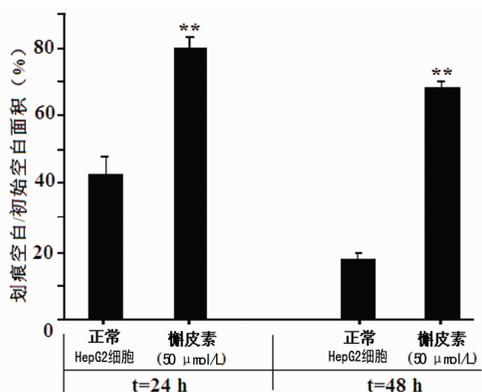


图 1 不同浓度槲皮素对 HepG2 细胞生存抑制效果



上排:槲皮素;下排:正常 HepG2 细胞;A:1 h;B:24 h;C:48 h。

图 2 HepG2 细胞下的表达(倒置显微镜,×10)



** $P < 0.05$, 与正常 HepG2 细胞比较。

图 3 划痕实验空白面积比较

2.2 槲皮素对 HepG2 细胞增殖的影响 MTT 显示,槲皮素对 HepG2 细胞生长有明显抑制作用,且具有剂量和时间依赖性。药物处理 24 h 后,槲皮素浓度为 10、20、50、100 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 的抑制率分别为 8%、18%、22%、27%、27%;药物继续作用至 48 h,50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的抑制作用明显提高,达到 51% (IC₅₀),细胞生存抑制作用比较见图 1。

2.3 加入槲皮素前、后 HepG2 迁徙能力的变化 正常生长的 HepG2 细胞生长旺盛,迁徙能力强,24 h 划痕面积明显减小,48 h HepG2 细胞几乎全部覆盖划痕。而在加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素作用 48 h 后,HepG2 细胞的迁徙能力明显减弱(图 2)。对残留划痕面积进行比较,两组差异有明显的统计学意义(图 3), $P < 0.05$ 。

2.4 槲皮素作用前、后 HepG2 细胞中 IQGAP1 蛋白的表达

实验 48 h 获取 Western blot 结果(图 4)相对于正常生长的 HepG2 细胞来说,加入槲皮素(50 $\mu\text{mol/L}$)充分作用后,细胞中 IQGAP1 蛋白表达明显减低。

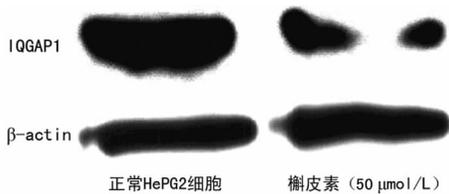


图 4 Western blot 检测槲皮素作用前、后 HepG2 细胞中 IQGAP1 蛋白的表达

3 讨论

槲皮素在恶性肿瘤、炎症反应的作用是目前生命科学的研究热点。本实验主要观察槲皮素在 HepG2 细胞生长增殖和转移迁徙中的抑制作用。结果显示,槲皮素能明显抑制 HepG2 细胞的增殖生长,并对其迁徙能力产生强大的负调控作用。

关于槲皮素发挥抑制恶性肿瘤细胞生长的机制,目前的研究表明可能与下列因素有关:(1)失活原癌基因 akt-1、bcr、ras,上调抑癌基因 p21、p53 等表达^[5];(2)抑制肿瘤新生血管生成:VEGF 是血管生成的重要调节因子,而槲皮素则可以高效抑制 VEGF 表达^[6];(3)诱导凋亡:槲皮素能上调 Bax、Bad、Bcl-x 等促凋亡基因,抑制凋亡负调控分子 Bcl-2 而诱导凋亡^[7];(4)阻遏热休克蛋白(heat shock protein, HSP)产物, HSP 是重要的分子伴侣蛋白,能减轻高热、低氧、化学药物等刺激对细胞的损伤。槲皮素能下调 HSP70、HSP72、HSP90 基因转录水平^[8];(5)抗氧化作用:槲皮素还能减弱细胞的氧化压力损伤^[9];(6)其他如逆转多药耐药(MDR)机制^[10]。

最近, IQGAP1 在恶性细胞黏附迁移中的中枢作用受到研究者的广泛关注。IQGAPs(Ras GTPase-activating-like protein)是真核细胞内一个相对保守的蛋白家族,位于染色体 15q26,具有 IQ 和 Ras-GTPase 激活蛋白相关结构域(Ras-GAP-related domain, GRD)。IQ 结构域由 4 个串联排列的 IQ 模体组成,能与钙调蛋白、肌球蛋白轻链和 S100B 结合^[11]。GRD 结构域可以和 Rho GTPase、cdc42、Rac1 结合^[12]。目前,人类至少发现了 3 个家族成员, IQGAP1、IQGAP2 和 IQGAP3。IQGAP1 是研究热点,许多学者认为由 IQGAP1 介导的细胞黏附迁移是肿瘤转移侵袭的基本步骤之一^[13]。这个生命过程中,在上游蛋白 Rac1、GTP 等信号调节下, IQGAP1 通过与 α -连环蛋白(α -catenin)、 β -连环蛋白(β -catenin)、钙调蛋白相互作用改变细胞之间的黏附能力^[14]。有学者发现在抑制 IQGAP1 功能后,恶性细胞的黏附迁移能力显著降低,与正常时比较表现为较低的侵袭力^[15]。

本研究观察到槲皮素作用前、后 HepG2 细胞生长及迁移能力的变化,并结合免疫印迹法中 IQGAP1 表达结果,推测槲皮素对 IQGAP1 基因的影响可能是其干扰 HepG2 细胞生长、减弱其黏附侵袭能力的途径之一。

参考文献:

[1] 周进,方丽,姚文秀,等. 细胞培养氨基酸稳定同位素标记——质谱技术测定槲皮素对人肝癌细胞热休克蛋白表达的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2011, 33(10): 737-741.

[2] Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, et al. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements(quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin)[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(8): 1450-1456.

[3] Kuo PC, Liu HF, Chao JL. Survivin and p53 modulate quercetin-induced cell growth inhibition and apoptosis in the human lung carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(53): 55875-55885.

[4] 罗进勇,李林,尹一兵. 槲皮素对人肺腺癌 A549 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 重庆医学, 2005, 34(4): 551-552.

[5] Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, et al. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors[J]. *Int J Cancer*, 2000, 85(3): 438-442.

[6] Tan WF, Lin LP, Li MH, et al. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential[J]. *Eur J Pharm*, 2003, 459(3): 255-262.

[7] Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(5): 647-659.

[8] Wei YQ, Zhao X, Kariya Y, et al. Induction of apoptosis by quercetin; involvement of heat shock protein[J]. *Cancer Res*, 1994, 15(54): 4952-4957.

[9] Alia M, Ramos S, Mateos R, et al. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 212(2): 110-118.

[10] Kim SH, Yeo GS, Lim YS, et al. Suppression of multidrug resistant via inhibition of heat shock factor by quercetin in MDR cells[J]. *Exp Mol Mnd*, 1998, 30(2): 87-96.

[11] Darerca O, Louise JC, Keily L, et al. The IQGAP1-Rac1 and IQGAP1-Cdc42 interactions; interfaces differ between the complexes[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(3): 1692-1704.

[12] Mataraza JM, Li Z, Jeong HW, et al. Multiple protein mediate IQGAP1-stimulated cell migration[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(9): 1857-1865.

[13] Ren JG, Li Z, Sacks DB. IQGAP1 integrates Ca^{2+} /calmodulin and B-Raf signaling[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(34): 22972-22982.

[14] Wang JB, Sonn R, Tekletsadik YK, et al. IQGAP1 regulates cell proliferation through a novel CDC42-mTOR pathway[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(12): 2024-2033.

[15] Dong PX, Jia N, Xu ZJ, et al. Silencing of IQGAP1 by shRNA inhibits the invasion of ovarian carcinoma HO-8910PM cells in vitro[J]. *J Wxp Clin Cancer Res*, 2008, 27(27): 77-87.